

⑫ 特 許 公 報 (B2)

平5-44946

⑤ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公告 平成5年(1993)7月7日
 C 07 D 327/00
 A 61 K 31/385
 31/39
 // C 07 K 15/00 ADV 7252-4C
 ADU 7252-4C
 7731-4H

発明の数 3 (全12頁)

⑬ 発明の名称 環式ジスルホン酸エステル化合物

⑯ 特 願 昭60-500579

⑮ 国際出願 PCT/US85/00057

⑰ 出 願 昭60(1985)1月14日

⑱ 国際公開番号 WO85/03075

⑲ 国際公開日 昭60(1985)7月18日

⑳ 公表番号 昭61-501089

㉑ 公表日 昭61(1986)5月29日

優先権主張 ㉒ 1984年1月16日 ㉓ 米国(US) ㉔ 570,786

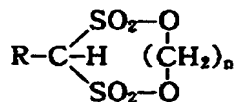
㉕ 発 明 者 クロニン, マーシャ アメリカ合衆国オレゴン97210、ポートランド、ノースウ
 ル・ダブリュ エスト・ルレイ・テラス3232番
 ㉖ 出 願 人 クロニン, マーシャ アメリカ合衆国オレゴン97210、ポートランド、ノースウ
 ル・ダブリュ エスト・ルレイ・テラス3232番
 ㉗ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名
 審 査 官 官 坂 初 男
 ㉘ 参 考 文 献 オーストリア国特許210874

1

2

㉙ 請求の範囲

1 式:



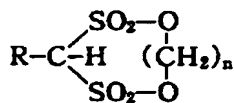
〔式中、RはH、CH₃、またはCH₂CH₃であり、
 nは、RがHの時、2～5であり、RがCH₃また
 はCH₂CH₃の時、2である〕

で示される環式ジスルホン酸エステル化合物。

2 RがHである第1項に記載の化合物。

3 nが2または5である第2項に記載の化合物。

4 式:



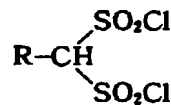
〔式中、RはH、CH₃、またはCH₂CH₃であり、
 nは、RがHの時、2～5であり、RがCH₃また 20

はCH₂CH₃の時、2である〕

で示される環式ジスルホン酸エステル化合物の製造方法であつて、

式:

5

〔式中、RはH、CH₃、またはCH₂CH₃である〕

10 で示されるアルカンジスルホニルクロリドを炭酸
 銀と反応させて相当するアルカンジスルホン酸銀
 を生成させ、そのジスルホン酸銀を式:

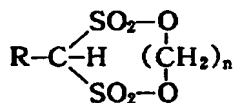


〔式中、XはBrまたはI、nは2～5である〕

15 で示されるジハロアルカンと反応させることを特
 徴とする方法。

5 式:

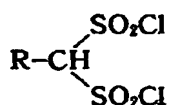
3



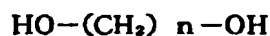
〔式中、RはH、CH₃、またはCH₂CH₃であり、
nは、RがHの時、2～5であり、RがCH₃また
はCH₂CH₃の時、2である〕

で示される環式ジスルホン酸エステル化合物の製
造方法であつて、

式：



〔式中、RはH、CH₃、またはCH₂CH₃である〕
で示されるアルカンジスルホニルクロリドを式：



〔式中、nは2～5である〕

で示されるアルカンジオールと、テトラヒドロフ
ランまたはグライムおよび脂肪族第3級アミンま
たは芳香族第3級アミンの存在下、-20℃以下の
反応温度で反応させることを特徴とする方法。

1 発明の分野

本発明は二官能性アルキル化合物に関し、更
に詳しくは、環式ジスルホン酸エステルアルキ
ル化合物に関する。

2 背景

アルキル化剤は、癌の主要な化学療法化合物で
ある。臨床的に使用されている大部分のアルキ
ル化剤は、2本鎖DNAの相対する鎖、即ちDNAお
よびそれに関連するタンパク質などの生体分子と
反応し、これをフラグメント化するか、または架
橋結合させ得る2個の化学反応中心を持った二官
能性化合物である。このアルキル化剤を使用して
生体分子をアルキル化すると、細胞内代謝、特に
核酸の複製および／または転写に於いて種々の欠
損が生じるが、これは、正常な体細胞よりも急速
に増殖する癌細胞にとって、より致命的なことだ
る。

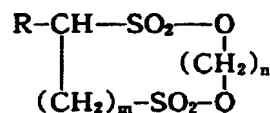
二官能性アルキル化剤の1種に、通常白血病の
治療に使用される線状の非電荷ジスルホネート
があり、その一例としてブサルファン (Busulfan)
〔ミレラン (Myleran)、ブロー・ウェルカム
(Burroughs Wellcome)〕が挙げられる〔ガイ

4

ド・ツー・セラピューチック・オンコロジー
(Guide to Therapeutic Oncology)、バーゲビ
ン (Bergevin), P.R.ら、編者：ウィリアムス
(Williams) およびウィルキンス (Wilkins)、パ
ルチモア／ロンドン (1979)、p110〕。この種
の化合物は、標的となる生体分子、例えばDNA塩
基と求核反応することにより作用を開始し、この
標的をアルキル化し、遊離の、荷電したスルホン
酸基を分離させる。次に非荷電スルホン酸エス
テルアルキル化基が第2の求核反応を起こし、も
との標的分子と第2の標的とを架橋し、第2のス
ルホン酸基を分離させる。即ち、この二官能性反
応系には、非荷電中間体アルキル化基が関与す
る。この1, 4-ブタンジオールスルホネート
〔ブサルファン (Bulsulfan)〕は、これよりア
ルキル鎖の短い、あるいは長い線状スルホネート
類よりも治療効果が高い。

3 本発明の要約

本発明は一般構造式：



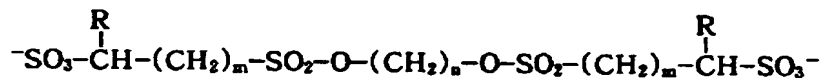
〔式中、m=0または1、n=1～5、R=H、
CH₃、CH₂CH₃またはCl〕

で示される環式ジスルホン酸エステルに関するも
のである。本発明の化合物は、DNAの如き生体
分子をフラグメント化したり、あるいは核酸類や
その関連タンパク質の様な各種の求核性含有生体
分子を架橋結合させるための二官能性薬剤として
有用である。m=0、n=2、そしてR=Hである
環式ジスルホン酸エステルは、哺乳動物のリン
パ球性白血病、リンパ球様白血病、黒色癌、ヒト
の乳癌多植腫瘍 (ヒトの乳癌をマウスの腎臓に移
植して作成した腫瘍) および卵巣癌を含む種々の
動物の癌の治療に有効である。m=0、n=3ま
たは4、R=Hである環式ジスルホン酸エステル
類も抗白血病活性があることがわかった。

線状ジスルホン酸エステル類とは違つて (この
場合はブタンジオール化合物が最も治療活性が高
い)、本発明の環式化合物の中では、エタンジオ
ール (n=2) およびペンタンジオール (n=5)
のジスルホン酸エステルが白血病動物を治療
するのに最も有効である。本発明の環式エステル

類は、本明細書に示した様に、白血病以外の癌、特に黒色癌、乳癌移植腫瘍（プレスト・キセノグラフト）および卵巣癌の治療にも有効である。

ブサルファンのような非荷電線状アルカンジスルホネート類と違って、ジエステル環が開き、本発明の環式ジエステル化合物への、初めの求核的攻撃によつて、荷電スルホン酸末端基を持った中間体線状スルホネートが生じる。従つて、本発明は、より一般的には、最初のヌクレオフアイル*



で示される線状化合物であつてもよい。

本発明はまた、前記の環式ジスルホン酸エステル化合物の合成法を提供するものである。前記の構造に於いて $n=1$ である環式ジスルホン酸エステルを合成するための特に有用な 1 つの方法は、アルカンジスルホニルクロリドを銀塩と反応させて相当する銀ジスルホネートを生成させ、これをジブロモエタンまたはジヨードメタンの様なジハロアルカンと反応させる。 $n=2\sim 5$ である化合物を製造するのに有用な第 2 の方法は、脂肪族または芳香族第 3 級アミン、例えばトリエチルアミンまたはコリジンの存在下でアルカンジスルホニルクロリドを直接アルカンジオールと反応させることである。生成したエステルによるアミンのアルキル化を避けるために、第 3 級アミンを、その他の反応体に、低温で滴下する。

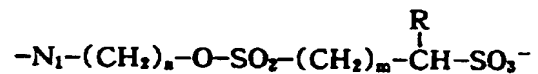
本発明のもう 1 つの目的は、治療有効量の環式ジスルホン酸化合物で癌にかかっている哺乳動物を処置することからなる、哺乳動物の癌、特にリンパ球性およびリンパ球様白血病、黒色癌、ヒトの乳癌移植腫瘍および卵巣癌を治療する方法を提供するものである。

本発明の総体的な目的は、種々のタイプの癌の治療に有効な新しい系列の架橋結合化合物を提供することにある。

本発明のもう 1 つの目的は、第 1 番目のヌクレオフアイルと反応して荷電したスルホン酸末端基を持ったヌクレオフアイル-反応性中間体を生成し得るジスルホン酸エステル二官能性架橋結合剤を提供することにある。

更に、本発明のもう 1 つの目的は、薬物試験および製造にみあう収率で容易に製造される環式二

* N_1 と反応して式：



〔式中、 n 、 m および R は前記と同意義である〕で示されるヌクレオフアイル-反応性中間体を生成することができる二官能性架橋結合剤を包含するものである。この結合剤は前記の環式化合物のタイプであつてもよい式：

官能性アルキル化合物群を提供することにある。

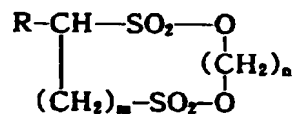
本発明のこれらの目的や特徴、およびその他の目的や特徴は、以下の本発明の詳細な説明および実施例から、より明らかとなろう。

本発明の詳細な説明

本発明の環式ジスルホン酸エステルは、以下の第 1 節に述べる新規な方法により合成される。第 2 節では、DNA 鎖の破壊および関連タンパク質への DNA の架橋結合を生じる環式ジスルホン酸エステルと DNA との反応について述べる。この節では、荷電したスルホン酸末端基を持った線状ジスルホン酸エステルについても考察する。この化合物は、環式化合物の場合と同様に 2 本鎖 DNA と反応する。この線状の荷電架橋結合剤の合成法についても記載する。5 つの異なつたタイプの哺乳動物の癌の治療に選択された環式ジスルホン酸エステル化合物を使用する各種の薬物治療法については第 3 節で概説する。

I ジスルホン酸エステル架橋結合剤の合成

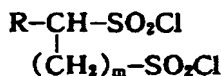
本発明は一般構造式：



〔式中、 $m=0$ または 1 、 $n=1\sim 5$ 、 $\text{R}=\text{H}$ 、 CH_3 、 CH_2CH_3 または Cl である〕

で示される環式ジスルホン酸エステルを提供するものである。

第 1 番目の合成法は、 $n=1$ であるこのタイプの化合物の合成に特に適している。この方法は一般に、式：



〔式中、 m および R は前記と同意義である〕

で示されるアルカンジスルホニルクロリドを、相
当する銀ジスルホネートが得られる条件下で、銀
塩、好ましくは炭酸銀と反応させることからな
る。実験の結果、この反応は完全に無水の条件
下で暗所で行なうのが好ましいことがわかった。メ
タンジスルホニルクロリドの様なアルカンジスル
ホニルクロリドを、アセトニトリルの様な適当な
溶媒に溶かし、この溶液に、ジスルホニルクロリ
ド1モル当たり2モルよりやや過剰の銀の割合
で、炭酸銀の様な銀塩を添加する。この混合物の
初期の発熱反応の間40℃以下に保ち、次いで室温
で24時間攪拌する。生成した塩化銀の粉末を濾去
する。以下の実施例1で述べる方法により、理論
量の約88.5%に当たるメタンジスルホン酸銀が得
られる。

この合成法の第2段階では、生成したてのアル
カンジスルホン酸銀を式：



〔式中、 $n=1\sim 4$ 、 X は臭素または沃素であ
る〕

で示されるジハライドと反応させる。例えば、適
当な溶媒、例えばアセトニトリルに溶解したメ
タンジスルホン酸銀を、約1:1のモル比でジハラ
イドに加え、この混合物を室温で数週間放置す
るか、あるいは光の存在下で数日間加熱還流す
る。沈殿した銀塩を濾過し、濾液を減圧下で蒸発さ
せると通常淡褐色の油状残留物が得られ、これに所
望の生成物が含まれている。この残留物を塩化メ
チレンの様な適当な溶媒に溶かし、これを脱色炭
の様な精製剤をその溶媒に加えて処理してもよ
い。この生成物を結晶化させるため、シクロヘキ
サンの様な2番目の溶媒を、上澄が濁るまで添加
する。シクロヘキサン：塩化メチレン (2:1)
の溶媒系で再結晶して所望の純度にしてもよい。
生成物の確認は、例えば CH_2 および SO_2 伸縮振動
の様な赤外 (IR) 特性値、および、例えば CH_2
- SO_2 プロトン、末端- CH_2 - O プロトンおよび
中央の CH_2 プロトンなどのプロトン核磁気共鳴
(NMR) 特性値によって行なうことができる。
更に、生成物の元素分析実測値を理論値と比較す

ることによって、生成物を確認することができる。

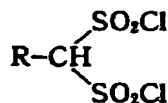
実施例IIは、1-4ジブロモブタンおよびメ
タンジスルホン酸銀からのテトラメチレンメタンジ
スルホネート ($m=0$, $n=4$, $R=H$)、別名
1, 5, 2, 4-ジオキサジチオカン-2, 2,
4, 4-テトロキシドの製造について記載してい
る。この方法で、再結晶後に小さい白色針状晶が
得られ、その最終重量によると通算収率は約3.79
%であつた。実施例IIIには、メタンジスルホン酸
銀と1, 3-ジブロモプロパンからトリメチレン
メタンジスルホネート ($m=0$, $n=3$, $R=$
 H 、別名1, 5, 2, 4-ジオキサジチオカン-
2, 2, 4, 4-テトロキシドを製造する方法が
記載されている。トリメチレンメタンジスルホネ
ートと同定された小さい白色結晶が約11%の収率
で得られた。実施例IVはエチレンメタンジスルホ
ネートの合成について記載している。この実施例
に記載されている別法の収率は、シクロヘキサン
-塩化メチレン混合物からの再結晶後、2.18%お
よび2.78%であつた。メチレンメタンジスルホネ
ート ($m=0$, $n=1$, $R=H$)、別名1, 5,
2, 4-ジオキサジチアカン-2, 2, 4, 4-テ
トロキシドの合成法は、実施例Vに記載されてお
り、ここではメタンジスルホン酸銀を、アセトニ
トリル中、略当モル量のジヨードメタンと反応さ
せている。全生成物の収率は約2.22%であつた。

本発明の新規な環式ジスルホネートエステル類
を合成するための第2の一般的方法は、 $m=0$ 、
 $n=2\sim 5$ 、 $R=H$ または CH_3 である構造の化合
物に特に好適である。この方法は、一般的に、
式：



〔式中、 $n=2\sim 5$ である〕

で示されるジオールをテトラヒドロフランまたは
エチレングリコールのジメチルエーテル (グライ
ム) などの溶媒に添加し、この溶液に、同じ溶媒
に入れた式：



〔式中、 $R=H$ または CH_3 である〕

で示される約当モル量のアルカンジスルホニル

ロリドを加える。この混合物を少なくとも約-20℃に冷却し、脂肪族または芳香族第3級アミンを滴加する。好ましい第3級アミンにはトリエチルアミンおよびコリジン、第3級芳香族アミン、が含まれる。この反応混合物を0℃またはそれより僅かに高い温度まで温め、生成した塩酸塩を濾去する。濾液を減圧下で蒸発させ、通常、淡黄色油を含んでいる残留物を適当な溶媒、例えば塩化メチレンに溶解する。塩化メチレン：シクロヘキサンなどの適当な溶媒から再結晶すると、所望の再結晶生成物である軽い結晶性粉末が得られる。生成物は、前記した様なIRおよびNMR特性値および元素分析により確認することができる。

実施例VIは、上に記載した方法でペンタメチレンメタンジスルホネート ($m=0$, $n=5$, $R=H$)、別各1, 5, 2, 4-ジオキサジチオカン-2, 4, 4-テトロキッドを製造する方法を記載している。グライム中の1-5-ペンタンジオール溶液を、同一溶媒に入れたメタンジスルホニルクロリドと混合し、この混合物に、無水条件下でトリエチルアミンを滴加した。アミンの塩酸塩残渣を除いて溶媒を蒸発させた後、油状残留物を塩化メチレンに再溶解し、水性洗液で3回洗浄し、塩化メチレン：シクロヘキサン溶媒系から結晶化させた。この方法により約6.75%の収率で純生成物を得た。実施例VIIおよびVIIIは、コリジンを滴下しながらテトラヒドロフラン中でエチレングリコールとメタンジスルホニルクロリドからエチレンメタンジスルホネート ($m=0$, $n=2$, $R=H$) を合成する同様の反応について記載している。再結晶した生成物を25%の収率で得た。実施例IXおよびXは、それぞれトリメチレンおよびテトラメチレンメタンジスルホネートを製造するための同様の反応について記載している。

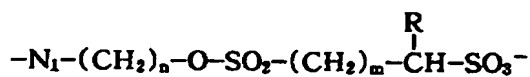
実施例XI-XIVは、 $n=5$ (実施例XI)、 $n=4$ (実施例XII)、 $n=3$ (実施例XIII) および $n=2$ (実施例IX) の1, 1-エタンジスルホネート ($m=0$, $R=CH_3$) の合成について記載している。 $n=1$ である環式ジスルホネート化合物はこの合成法では製造することができないことに注意すべきである。実施例XIでは、ペンタメチレン1, 1-エタンジスルホネートが2%の収率で得られた。実施例XIIでは、精製したテトラメチレン1, 1-エタンジスルホネートが0.2%の収率で

得られた。実施例XIIIの方法により、トリメチレン1, 1-エタンジスルホネートが約36%の収率で得られ、実施例XIVでは精製したエチレン1, 1-エタンジスルホネートが25%の収率で得られた。

ここに記載した一般的な合成法に於いて、特にアルカンジスルホニルクロリド出発物質について変更を加えることにより、提示した各種のRおよびm値の化合物を製造し得ることは実施例から明らかであろう。

II 環式ジスルホネートエステルアルキル化反応

本発明の環式ジスルホン酸エステル化合物は、ヌクレオフイル含有生体内分子と反応することができる化学反応中心を各 CH_2-O 基炭素に持っている。1番目のヌクレオフイル ($-N_1$ と呼ぶ) と環式ジスルホン酸エステルとの初期アルキル化反応の結果、式：

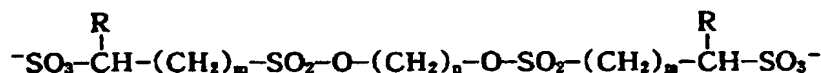


で示される負に荷電した SO_3^- で末端基を持った線状の中間体が生成する。この線状化したアルキル化中間体は、環式化合物とは著しく異なった溶解性および荷電特性を持っていることは理解されるはずである。これらの荷電および溶解特性が、この化合物が、アルキル化された生体内分子に対してとる立体配置に影響を与えると期待される。具体的にいうと、この荷電した末端基は、2本鎖DNAに関連している正に荷電したヒストンと相互作用する。本発明を支持するために行なわれた予備実験の結果、環式エチレンジスルホン酸エステル ($n=2$) は、ヒト胎児肺線維芽細胞、IMR-90セルラインおよびそのSV-40-形質転換対応物、VA-13セルライン (これは、グアニンのO6位に於ける小アルキル障害を修復する能力を欠いている) の両者に於いて、DNAとDNA関連タンパク質を架橋結合させる活性を有することが判明した。興味あることは、 $n=2$ の化合物で処理された両細胞に於いて、両方のフランク鎖のハイレベルな破壊およびアルカリ不安定障害 (pH12.6) が観察されたが、 $n=2$ の化合物で処理された細胞中ではDNA/DNA架橋がほとんど、あるいは全く観察されなかつたことである。検出された鎖の破壊がハイレベルであつたこと、

11

およびIMR-90セルライン（これはグアニンの06位に於ける小さいアルキル障害を除去することができる）に於いて毒性が低かったことは、観察された鎖の破壊は薬物によつて惹起されるのではなく、酵素の修復活性によつて惹起されることを示唆している。

初期のアルキル化に続いて、線状化した荷電コンプレックスが、第2のヌクレオフイル N_2 と、*



〔式中、 $m=0$ 、 $n=1\sim 5$ 、 $R=H$ 、 CH_3 、 CH_2CH_3 または Cl 〕

で示される。この構造をみると、 $O-CH_2$ 炭素に於ける、ヌクレオフイル N_1 による初期の求核攻撃により、相当する環式ジスルホン酸エステルが関与する初期求核反応の結果生じるコンプレックスと同じ N_1 -アルキル化剤コンプレックスが生じることがわかる。

実施例XVは、1, 2-ビス（オキシスルホンメタンジスルホン酸）エタン（ $m=0$ 、 $R=H$ 、 $n=2$ ）の合成法を示している。この方法では、メタンジスルホンクロリドを、ジエチルエーテルの存在下で水と反応させ、相当するクロロスルホンメタンジスルホン酸を生成させる。この化学中間体のスルホン酸基を、既知の方法に従い、トリメチルシリルクロリドまたは t -ブチルジメチルシリルクロリドと反応させて保護する。次いでこの化合物をグライムの様な適当な溶媒中、芳香族または脂肪族の第3級アミン、例えばトリエチルアミンを $-20^\circ C$ で滴加しながら、エチレングリコールと反応させる。その生成物を H_2O および重炭酸塩で処理して化合物中のシリルエステルを加水分解し、この生成物の所望の塩を生成せしめる。

■ 環式メタンジスルホネートエステルの抗癌活性

種々のタイプの哺乳動物の癌に対する環式メタンジスルホネートの有効性を調べた。この実験では、以下のタイプの癌のいずれか1つを持つていると確認されたマウスの個々の個体を使用した：リンパ球性白血病、リンパ球様白血病、黒色癌、ヒトの乳癌移植腫瘍および卵巣癌。それぞれのタイプの癌につき、ほぼ同じサイズおよび体重の

12

* 2番目の求核反応に関与することができ、架橋結合した $-N_1-(CH_2)_m-N_2$ コンプレックスを形成し、第2の荷電スルホン酸を放出する。

本発明は、もつと一般的に言えば、初期アルキル化反応の後のスルホン酸末端基により特徴づけられるジスルホン酸エステルを目的物質とするものである。この性質を持った線状ジスルホン酸エステルは、一般構造式：



一群の動物を、被験薬物の量が増加していく各種投与レベルの1つで処置して最適投与量を決めた（これは、最大の存在期間または腫瘍増殖阻止によつて判定した）。

各試験に於いて、動物を等しい動物数の2群にわけた。対照群には薬物の担体のみを与え、処置群には担体に入れた最適投与量の薬物を与えた。リンパ球性白血病、リンパ球様白血病、黒色癌および卵巣癌に関する実験では、対照動物の生存日数の中央値(C)に対する処置動物の生存日数の中央値(T)の割合、即ち T/C 比、で薬物の有効性を表わした。ヒト乳癌移植腫瘍に対する薬物の有効性は、対照動物の腫瘍サイズ(C)に対する処置動物の腫瘍サイズの比で表わした。

エチレンメタンジスルホネート薬物処置の処置プロトコールおよび得られた結果を実施例XVIに記載した。そのデータによると、エチレンメタンジスルホネートは、実施例に記載された全てのタイプの癌について、生存期間を延長し、または腫瘍の増殖を阻止する。

更に、 $n=2\sim 4$ の架橋結合鎖長を持つた環式ジスルホン酸エステルの治療効果を比較する目的で、リンパ球性白血病のマウス2群を、トリメチレンメタンジスルホネート（ $n=3$ ）およびテトラメチレンメタンジスルホネート（ $n=4$ ）のいずれかで処置した。試験条件およびプロトコールは実施例XVIの試験の場合と実質的に同じであり、 $n=3$ および $n=4$ の化合物について、それぞれ実施例XVIIおよびXVIIIに記載した。トリメチレンおよびテトラメチレンメタンジスルホネート化合物は共に、 T/C 比で測定した結果、有意な抗白血病活性を示した。しかし、白血病動物の生存期間を延長させる点では、両者とも、環式エ

チレンメタンジスルホネートエステルより明らかに有効性が劣っていた。

以上のことから、本発明の各種の目的が理解されよう。本明細書に記載の環式ジスルホン酸エステルは、その構造および反応性が非荷電線状ジスルホン酸エステルと全く異なる新しい系列の架橋結合剤である。本発明に係る新規化合物群の内の1つは、白血病、卵巣癌、黒色癌およびヒトの乳癌移植腫瘍を含む種々の癌の治療に有効であることが判明した。

本発明の化合物は、本明細書で詳述した方法のいずれか1つ、または両方の方法で容易に製造され、その化合物の内の数種のものは、約25%以上の収率で得ることができる。

以下に各種の合成法および処置プロトコールについて実施例を挙げるが、これは本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

実施例 I

無水メタンジスルホン酸銀の製造

全製造工程を、完全に無水な暗条件下で実施した。ガラス器具はすべて、乾燥機中、110℃で少なくとも1時間半加熱した。メタンジスルホニルクロリドは、既知の方法で合成した〔例えばシュローター、G. アナーレン・デア・ケミー (Schroeter, G., Ann Chem) (1919) 161-257 参照〕。再蒸留したメタンジスルホニルクロリド (2.00 g, 0.009 モル) を、バーディック・アンド・ジャクソン研究所 (マスケーゴン、ミシガン) [Burdick and Jackson Laboratories (Muskegon MI)] から入手したアセトニトリル 15 ml に入れて平衡滴下ロートに移した。アセトニトリルは、P₂O₅を入れて蒸留した。J.T. ベーカー・ケミカル社 (フィリップスバーグ、ニュージャージー) [J. T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ)] より入手した分析等級の炭酸銀 (99.8%) を量り (5.22 g, 0.019 モル)、平衡ロート、乾燥管付きの還流冷却器および温度計を備えた三口フラスコに入れた。攪拌バーを入れた後、ジスルホニルクロリド溶液を徐々に滴下した。混合物は発熱し、気体が発生した。氷水浴に入れて温度を40℃以下に保った。攪拌バーをなるべく早く始動させ、混合物を室温で約24時間攪拌した。反応混合物を濾過して、塩化銀および未反応の炭酸銀を含有する淡紫色の粉末を得た。乾燥

した後の粉末の重量は2.99 gであり、炭酸銀が完全に反応した場合の塩化銀の理論重量を0.29 g 上回った。この数値に基くと、濾液中のメタンジスルホン酸銀の収率は約88.5%であった。

5 実施例 II

テトラメチレンメタンジスルホネートの製造

アルドリッチ・ケミカル社 (ミルウォーキー、ウィスコンシン) [Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)] より入手した純粋な1, 4-ジブロモブタン (2.03 g, 0.009 モル) を、新しく調製した実施例 I のアセトニトリル中のメタンジスルホン酸銀溶液 100 ml を入れたフラスコに加えた。フラスコに栓をして暗所に室温で8週間置くと、その間に黄緑色の沈殿が生成し、フラスコの底に沈んだ。この懸濁液を濾過し、濾液を乾燥アセトニトリルで洗滌すると、臭化銀懸濁した。この懸濁液を濾過し、濾液を実施例 I に従って乾燥した。濾過物の乾燥重量は2.34 グラムであり、ジブロモブタンとメタンジスルホン酸銀が完全に反応した場合に生じる臭化銀の理論重量の67.7%であった。

もとの濾液を減圧下で乾燥すると、淡茶色の油状物質が得られた。この油状物質を塩化メチレンで洗滌すると、茶色のゴム状物質および濁った上清が得られた。上清をデカントして脱色炭で処理した。濾過して脱色炭を除去すると無色透明な溶液が得られた。減圧下で溶媒を除去すると微小な白色の立方体結晶が得られた。この結晶をシクロヘキサン-塩化メチレン (2/1) 混液より再結晶した。微小な白色の針状結晶が得られ、乾燥した後秤量した。その重さは、0.082 g であり、これは収率3.79%に相当する。生成物の融点は、143-144℃であった。生成物のNMRおよびIRスペクトル分析は、テトラメチルメタンジスルホネートと思われるスペクトル特性を示した。生成物の元素分析 (C₈H₁₆O₈S₂として) は理論値がC、26.08; H、4.38; S、27.85であり、実測値はC、26.08; H、4.77; S、27.66であった。

実施例 III

トリメチレンメタンジスルホネートの製造

新しく調製した実施例 I の乾燥アセトニトリル 100 ml 中のメタンジスルホン酸銀溶液に、アルドリッチ・ケミカル社より入手した純粋な1, 3-ジブロモプロパン (4.76 g, 0.024 モル) を加え

た。この混合物を82°で3日間加熱還流すると、黄緑色の粉末が生成した。この粉末を濾過し、乾燥アセトニトリルで洗滌した後、濾過し、乾燥し、次いで重さを量った。乾燥重量5.92グラムは、ジブロモプロパンとメチレンメタンジスルホン酸銀の完全な反応に基く臭化銀の期待重量の65.5%に相当する。還流反応物の溶媒を減圧下で除去し、残留した由状物質を実施例IIにおけるテトラメタンジスルホネートの精製に記載した方法で処理した。得られた微小な白色結晶は0.563グラムであつて、これは収率11%に相当し、融点156~157.5℃および185.5~186.5℃を示す。2回再結晶した化合物のNMRおよびIRスペクトルは、トリメチレンメタンジスルホネートに特有の特徴を示した。元素分析 ($C_4H_8O_6S_2$ として) は理論値がC、22.22; H、3.72; およびS、29.66であり、実測値はC、22.31; H、3.69; およびS、28.91であつた。

実施例 IV

エチレンメタンジスルホネートの製造

新しく調製した、実施例Iに従つて得られたアセトニトリル約100ml中のメタンジスルホン酸銀溶液に、アルドリッチ・ケミカル社より入手した純粋な1, 2-ジブロモエタン (4.42g、0.024モル) を加えた。82℃で4日間加熱還流した後、反応混合物を冷却して濾過した。こうして得られた黄緑色の粉末をアセトニトリルで洗滌し、乾燥して重量を測定した。この乾燥粉末4.01グラムは、反応が完全に行なわれた場合に生じる臭化銀の重量の44.5%に相当する。還流反応物より得た濾液を減圧下で除去すると淡茶色の粘性の油状物質が得られた。この油状物質を、実施例IIと同様に塩化メチレンで処理すると、濁った白色の上清および不透明な茶色のゴム状物質が生成した。上清をデカントして脱色炭およびケイソウ土で処理した。これを濾過した後の溶液は無色透明であつた。減圧下で溶媒を除去すると微小な白色結晶が得られた。これをシクロヘキサン-塩化メチレン混液より再結晶し、真空乾燥した。乾燥後の重量は0.113gであつて理論収量の2.18%に相当し、融点は約170℃であつた。再結晶した生成物のIRおよびNMRスペクトルはエチレンメタンジスルホネートに特有な特徴を示した。元素分析は $C_2H_4O_3S_2$ の計算値に一致した。

純粋な1, 2-ジブロモエタン5.09g (0.028モル) およびメタンジスルホン酸銀溶液100mlを使用して、上記と同じ操作を行なつた。反応は82℃で1日加熱還流して行なつた。黄緑色の粉末は3.55gあり、AgBrの期待重量より0.75g少なかった。総重量0.162g、収率2.78%の微小な白色針状結晶を得た。

実施例 V

メチレンメタンジスルホネートの製造メタンジスルホン酸銀溶液約100mlを入れたフラスコに、還流冷却器および乾燥管を付けた。アルドリッチ・ケミカル社より入手した純粋なジヨードメタン (5.09g、0.019モル) を加え、溶液を2日間加熱還流した。生成した淡黄色の粉末を実施例IIと同様にして、濾過し、洗滌し、次いで乾燥した。乾燥した沈殿の重量は5.79gであり、期待されるAgIの重量の72.0%に相当した。濾液を実施例IIに記載した方法で処理すると、総重量0.081グラム、収率2.22%、融点146℃~146.5℃の微小な白色針状結晶が得られた。さらに再結晶を行つた後の白色針状結晶のIRおよびNMRスペクトル分析は、メチレンメタンジスルホネートに特有な特徴を示した。元素分析 ($C_2H_4O_3S_2$ として); 理論値: C、12.76; H、2.14; S、34.09、実測値: C、12.91; H、2.14; S、34.16

実施例 VI

ペンタメチレンメタンジスルホネートの製造

本実施例および以下の実施例VII-VIIIは、アルカンジスルホニルクロリドと、 $HO-(CH_2)_n-OH$ [式中、 $n=2, 3, 4$ または5である] で示される型のジオールの反応による環式アルカンジスルホン酸エステルの合成を説明するものである。パーデイック・アンド・ジャクソン研究所より入手したエチレングリコールのジメチルエーテル (グリム) をナトリウムおよびベンゾフェノンを入れて蒸留し、精製した。精製したグリム350ml中に入れた、アルドリッチ・ケミカル社より入手した1, 5-ペンタンジオール (12.5g、0.12モル) 溶液を、スターラーおよび温度計を備えた1ℓの三口丸底フラスコ中で攪拌した。反応フラスコはドワールドライアイス浴で-20℃の温度に保つた。フィールド・M.およびリーク・H.P. (Field, M. and Rieck, H.P.) のケム・ツァイツング (Chem Zeitung) (1976) 109(9) 9):

391に記載された方法によつて調製したメタンジスルホニルクロリド (25.6 g、0.12モル) をグライム25mlに溶解したものを60mlの滴下ロートより徐々に加えた。イーストマン・オーガニック・ケミカルズ (Eastman Organic Chemicals) (ロチェスター、ニューヨーク (Rochester, NY)) より入手したトリエチルアミン (24.3 g、0.24モル) をグライム125mlに入れた溶液を、1時間で容器に滴下した。CaCl₂を入れた乾燥管を滴下ロートに付けて水との接触を避けるように注意した。滴下が完了した後、反応混合物を室温に戻して2時間攪拌した。

反応混合物を減圧濾過して固形のトリエチルアミンヒドロクロリドを除去した。固状のアミン塩酸塩残留物質をグライムで洗滌し、次いで乾燥すると重さは37.0 gであつて、これは理論上の収量の104%に相当した。濾液をロータリーエバポレーターを使用して37℃以下で蒸留し、グライムを除去した。残留物を塩化メチレン100mlに再溶解した後、以下の一連の冷却した水性洗液で洗滌した：(a) 5%の重炭酸ナトリウム30mlで3回、(b) 蒸留水30mlで1回、および(c) 5%の塩酸30mlで3回。これらの洗液は4℃に冷却して生成物の加水分解を最小限にした。最終的に得られた有機層をMgSO₄で乾燥した後、ロータリーエバポレーターを使用して塩化メチレンを留去した。粗生成物を最小量の塩化メチレンに再溶解した。シクロヘキサンを加えて混合物を1か月間冷蔵庫に置き、混合物が透明になったら周期的にシクロヘキサンを追加し、生成物の結晶化を促進した。生成した白色の粉末を濾過し、次いで乾燥した。総量0.22グラム、収率6.75%の結晶化した生成物を得た。この生成物は102℃~105℃で分解する。この化合物は、特有のCH₃、SO₂のIR特性およびCH₂-(SO₂)₂、CH₂-O、-CH₂-のプロトンNMR特性によつて同定した。

実施例 VII

エチレンメタンジスルホネートの製造一方法2
バーディック・アンド・ジャクソン研究所より入手したテトラヒドロフランを、常法に従い、ナトリウムベンゾフェノンを入れて新たに蒸留した。アルドリッチ・ケミカル社より入手したエチレングリコール (1.24グラム) をテトラヒドロフラン200mlに入れた溶液を、乾燥管に連結した50

mlの圧平衡滴下ロート、攪拌機および低温温度計を備えた500mlの三口フラスコに入れた。この溶液を-20℃に冷却し、テトラヒドロフラン50ml中のメタンジスルホニルクロリド4.26グラム (0.02モル) を15分間で滴下ロートより加えた。次いで、テトラヒドロフラン120ml中のイーストマン・オーガニック・ケミカルズより入手したコリジン (4.85 g、0.04モル) を、約1時間で徐々にフラスコに加えた。反応混合物を10℃まで温めた後、生成したコリジン塩酸塩を濾去した。濾液を20mm圧のロータリーエバポレーターで濃縮した。残留物を高真空 (1-2mm) 下に約15分間置き、次いで5%の冷HCl50mlを加えてこの混合物を冷蔵庫で一晩放置した。濾過し、次に真空乾燥してメタンジスルホン酸のエチレングリコールエステル1.02 gを得たが、これは収率25%に相当し、m.p. 165-169℃であつた。生成物は、IRおよびプロトンNMRスペクトルで確認した。

実施例 VIII

エチレンメタンジスルホネートの製造一方法3
実施例VIIIに記載の方法を一部変更して、テトラヒドロフランの代わりにグライムを、コリジンの代わりにトリエチルアミンを使用した。トリエチルアミンの塩酸塩の濾過を行わず、最後の反応溶液を減圧蒸留した後に残留物を氷水に取つて濾過すると、メタンジスルホニルクロリド0.04モルよりエチレンメタンジスルホネート4.67 g (57%収率) が得られた。生成物を、95℃-102℃に加熱した浴中、0.5-1.0mmHgの真空下で昇華させて更に精製した。昇華によつて、NMRスペクトルによつて検出された不純物の1つが除かれ昭た。昇華した物質を生物試験にかけた。

実施例 IX

トリメチレンメタンジスルホネートの製造一方法2

エチレングリコールの代わりに1, 3-プロパンジオールを使用し、実施例VIIIに記載の操作を、溶媒としてグライムを使用し、塩基としてトリエチルアミンを使用して行なつた。グライムを蒸留した後の残留物を塩化メチレンに取り、続いて重炭酸ナトリウム、水、次いで5%の塩酸で洗滌した。無水硫酸マグネシウムで塩化メチレンを乾燥した後、シクロヘキサンを加えて結晶化をうながした。1, 3-プロパンジオール25.6 g (0.12モ

19

ル) およびトリエチルアミン24.3g (0.24モル) より、トリメチレンメタンジスルホネート2.6g (10%収率) を得た。この化合物は139℃-142℃の融点(分解)、およびIR並びにNMRスペクトルで確認した。

実施例 X

テトラメチレンメタンジスルホネートの製造方法2

エチレングリコールの代わりに1, 4-ブタンジオールを使用して実施例Ⅷに記載の操作と同じ操作を行ない、等モル量の試薬より7%収率のエステルを得、これをm.p.135℃-136℃(分解) およびIR、NMRスペクトルによつて確認した。

実施例 XI

ペンタメチレン1, 1-エタンジスルホネートの製造

1, 5-ペンタンジオール(4.17g、0.04モル)を1リットルの丸底フラスコ中のグライム350mlに溶解し、この溶液を-20℃に冷却した。メタンジスルホニルクロリド(実施例I)と同じ操作で合成した1, 1-エタンジスルホニルクロリドをグライム25mlに溶解し、この溶液をフラスコ中の溶液に滴下した。トリエチルアミン(8.08g、0.08モル)をグライム125mlに溶解し、この溶液を1時間でペンタンジオール/エタンジスルホニルクロリド溶液に加えた。添加完了後、この混合物を水浴中、45分間かけて25℃にした。混合物を35℃以下の温度で減圧回転蒸発させた。残留物を5%の重炭酸ナトリウム20mlで3回洗滌し、得られたエマルジョンを遠心分離した。この洗浄操作で最終的に得られた油状物質より水をデカントし、塩化メチレンを加えた。この溶媒は、明らかにすべての、あるいはほとんどの不純物を溶解したが、本生成物は溶液中に懸濁したままであった。この生成物は、溶液をワットマン#5(Whatman#5)定性ろ紙で減圧ろ過することによつて得られた。

乾燥した生成物は0.22グラム、収率約2%であった。生成物は、特有のIRおよびプロトンNMRスペクトルで確認した。生成物の分解は、141℃-142℃で起こった。化合物の溶解度が低いことは、乾燥した生成物0.03グラムをアセトニトリル1mlおよび塩化メチレン1mlに溶解して確認した。どちらの場合も不溶性の固形物よりデカント

20

した上清を蒸発させた結果、生成物、ペンタメチレンエタンジスルホネートが各溶媒に0.01グラム以下しか溶解しないことがわかった。

実施例 XII

5 テトラメチレン1, 1-エタンジスルホネートの製造

アルドリッチ・ケミカル社より入手した1, 4-ブタンジオール(3.6g、0.04モル)を1リットルの丸底フラスコ中のグライム75mlに溶解した。グライム25mlに溶解した1, 1-エタンジスルホニルクロリド(9.1g、0.04モル)溶液を滴下ロートよりフラスコに加えた。反応混合物をダウアノールドライアイス浴で-20℃以下に保った。グライム100mlに溶解したトリエチルアミン(8.08g、0.08モル)を、125mlの滴下ロートより1時間で混合物に加えた。CaCl₂を入れた乾燥管を滴下ロートに付け、無水条件を維持するようにした。反応混合物を冷水浴で25℃にした。グライムは、37℃以下の温度で回転蒸発させて除去した。グライムを除去した後に得られた油質の黄色残留物質を5%の重炭酸ナトリウム100mlで1回、および冷蒸留水50mlで1回洗滌し、生成したエマルジョンを直ちに遠心して生成物を分離し、水性の物質をデカントした。残留した沈殿を真空下で乾燥させた。得られた白色の粉末状固形物は0.90g、収率9.2%であった。生成物は、特有のIRおよびプロトンNMRスペクトル特性によつて確認した。生成物は115~138℃で分解した。生成物は塩化メチレンあるいはアセトニトリル1mlに約0.01グラム以下しか溶解しなかった。

実施例 XIII

トリメチレン1, 1-エタンジスルホネート

アルドリッチ・ケミカル社より入手した1, 3-プロパンジオール(6.1g、0.08モル)を、スターラーおよび温度計を備えた1ℓの三口丸底フラスコ中の蒸留グライム350mlに溶解した。フラスコの下に置いたダウアノールドライアイスで、溶液を-20℃に保った。グライム25mlに溶解した1, 1-エタンジスルホニルクロリド(18.2g、0.08モル)を60mlの滴下ロートより徐々に加えた。次いで、この容器にグライム125mlに溶解したトリエチルアミン(16.2g、0.16モル)混合物を1時間で滴下した。滴下ロートにCaCl₂を入れた乾燥管を付け、水との接触を避けるようにし

21

た。すべての添加が終った後、反応混合物を室温にして3時間攪拌した。

混合物を減圧濾過し、固体のトリエチルアミン塩酸塩を除去した。濾液を37℃以下の温度で回転蒸発させてグライムを除去した。7.95gの粗生成物を最小量の塩化メチレンに再溶解し、混合物に濁りが生じるまでシクロヘキサンを加えた。生成した最初の結晶を、減圧濾過して溶液より除去し、更にシクロヘキサンを加えて2番目の結晶群を生成させ、これも濾過して除去した。両者の結晶を冷蒸留水で洗滌して表面の油膜を除いた。得られた固形物の最終重量は収率36%に相当した。この化合物を予め加熱された融点測定装置に入れると、151℃~155℃で分解した。 CH_3CH および SO_2 のIRスペクトル特性により、および CH 、 CH_2O 、 $-\text{CH}_2-$ および $-\text{CH}_3$ のプロトンNMR特性によつて生成物を確認した。

実施例 XIV

エチレン 1, 1-エタンジスルホネートの製造

実施例XⅢに記載のトリメチレン 1, 1-エタンジスルホネートを製造する反応操作を採用し、実施例XⅢで使用した1, 3-プロパンジオールの代わりにエチレングリコール (5.0グラム、0.008モル) を用いて行なつた。反応混合物を室温で3時間攪拌して固体の残留物、アミン塩酸塩を除去した後、濾液を回転蒸発させてグライムを除いた。得られた粗生成物を最小量の塩化メチレンに溶解し、次いでマイクロヘキサンを加えると直ちに白色結晶が生成した。さらにシクロヘキサンを加えて遠心分離すると、総量5.84グラムとなる数群の結晶が得られた。この物質をさらに再結晶させて合計4.37グラムの生成物を得た。これは収率25.2%に相当した。生成物の融点は、92℃~93℃であつた。 CH_3CH および SO_2 についてのIRスペクトル特性および CH 、 CH_2 、 CH_3 についてのプロトンNMR特性によつて生成物を確認した。

実施例 XV

ナトリウム 1, 2-ビス (オキシスルホニルメタン) スルホネートのエタンの製造

メタンジスルホニルクロリド25.0g (0.117モル) を、無水エーテル200mlを入れた500mlの丸底フラスコに加えた。この溶液を予め攪拌しておき、氷浴で冷却しながら徐々に水2.1g (0.117モル) を加えた。水を加え終えた後、氷浴をはずし

22

て溶液を4時間攪拌した。回転蒸発してエーテルを除去し、PCR・リサーチ・ケミカルズ社 (PCR Research Chemicals, Inc.) (ゲインズビル、フロリダ (Gainesville, FL)) より入手し、新たに蒸留したトリメチルシリルクロリド37g (0.35モル) を気体の発生を制御するためのバブラーを使用しながら徐々に加えた。トリメチルシリルクロリドを加えた後、気体の発生が終わるまで、溶液を数時間加熱還流した。過剰量のトリメチルシリルクロリドを留去し、次いで残留物を精留すると、bp102℃~104℃、0.2mm圧で、あるいは110℃~111℃、0.4mm圧でトリメチルシリルクロスルホニルメタンスルホネート24g (77%) が得られた。生成物は、滴定およびNMRスペクトルにより確認した。

ナトリウムおよびベンゾフェノンより新たに蒸留して-20℃に冷却したグライム25ml中のトリメチルシリルクロスルホニルメタンスルホネート5.52g (0.0207モル) 溶液に、グライム25ml中のエチレングリコール0.62g (0.01モル) およびトリエチルアミン1.75g (0.02モル) 溶液を滴下した。次いで、この溶液を室温に戻して濾過し、グライムを蒸発除去した。水中の2当量の重炭酸ナトリウムを加え、気体の発生が終わつた後に水性溶液を塩化メチレンで洗滌し、次いで蒸発させて1, 2-ビス (オキシスルホニルメタン) スルホニルエタンのナトリウム塩を含有する白色の泡状残留物質を得た。

実施例 XVI

エチレンメタンジスルホネートの抗癌活性

この実験では、以下のタイプの癌のいずれか1つを持っていると確認されたマウスの個々の個体を使用した：リンパ球性白血病 (PS)、リンパ球様白血病 (LE)、黒色癌 (B1)、ヒトの乳癌移植腫瘍 (MB) および卵巣癌 (M5)。表1の左欄には、実施した6種類の実験系が記載されており、これには2つの異なつたリンパ球様白血病、LE31およびLE37が含まれている。各実験系において6~10匹の動物が使用され、表の投与量範囲の欄に示した1日量のエチレンメタンジスルホネートが投与された。表の左から第3番目の欄には、腹腔内 (IP)、脳内 (IC) または皮下 (SC) のいずれかの注入経路を示した。投与量範囲は、表示した注入経路による場合、特定の癌に対して

最も治療効果が高いことがわかった量である。同じ数の動物に、薬物を投与するのに使用した媒質のみを毎日投与した（対照）。

対照群および薬物処置群共に、全動物が死亡するまでこの投与を行なった。ただし、生存期間が対照群の3倍以上になった少数の実験系では、試験動物は治癒したものとみなした。表1の右欄に示したT/C比は、処置動物の生存日数の中央値(T)を対照動物の生存日数(C)の中央値で割ったものである。例えば、PS31実験系に於いてT/C270という値は、処置動物の生存日数の中央値が、非処置動物の生存日数の中央値の270%、即ち2.7倍であることを示している。ヒトの乳癌移植腫瘍の実験系（MBG5）では、処置動物の腫瘍サイズ対非処置動物の腫瘍サイズの値を示している。7という値は、処置動物の腫瘍の平均が非処置動物の増殖の約7%であることを意味している。

表 I

実験系	投与量範囲	注入経路	T/C値
3 PS 31	25-50mg/kg	IP	270
3 LE 31	25-50mg/kg	IP	271
06 LE 37	6.25-25.0mg/kg	IC	183
3 B 131	12.5-25.0mg/kg	IP	166
3 MB G5	50-300mg/kg	SC	(7)
3 M5 31(M)	12.5-50mg/kg	IP	217
3 M5 31(F)	25-50mg/kg	IP	267

表1のデータは、エチレンメタンジスルホネートが、実験した5つのタイプの癌の全てを治療するのに、種々の投与用範囲で有効であること、および薬物投与は、種々の注入経路で行ない得ることを示している。

実施例 XVII

トリメチレンメタンジスルホネートの抗白血病

活性 リンパ球性白血病に対するトリメチレンメタンジスルホネートの有効性を調べるために、表IのPS31に相当する実験を行なった。実験のプロトコールは実施例XVIのPS31実験系のもと同じであつた。ただし、最適投与量範囲、6.5~12.5mg薬物/体重kgで行なった。処置および非処置動物の生存日数の中央値に基いて計算したT/C比は160であり、これは、この薬物はリンパ球性白血病の治療に有効であるが、エチレンメタンジスルホネートより実質的に劣ることを示している。

実施例 XVII

テトラメチレンメタンジスルホネートの抗白血病活性

実施例XVIのPS31実験系と同様の実験系で、リンパ球性白血病の治療に於けるテトラメチレンメタンジスルホネート化合物の有効性を調べた。実施例XVIのPS31実験系に記載したものと同じ数の動物数および注入経路を含む同じ一般のプロトコールを使用した。ただし、テトラメチレンメタンジスルホネート化合物の最適投与量範囲、12.5~25mg/体重kgで行なった。処置および非処置動物の生存日数の中央値に基いて計算したT/C比は188であり、トリメチレンメタンジスルホネートの場合の結果と同様であつた。

以上、本発明の好ましい態様および特定の例について述べたが、本発明の思想を逸脱することなく種々の変更および改良を行なうことが可能であることは容易に理解されよう。